

#5
14

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

ATTORNEY DOCKET NO. 024018-0105

Applicant: Han Oh PARK et al.

Title: MICROORGANISMS FOR TREATMENT OR PREVENTION OF
CORPULENCE AND DIABETES MELLITUS, AND
PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING THE SAME

Appl. No.: 09/855,836

Filing Date: 05/16/2001

Examiner: Unassigned

Art Unit: 1633

CLAIM FOR CONVENTION PRIORITY

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

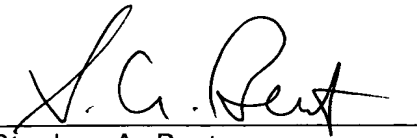
Sir:

The benefit of the filing dates of the following prior foreign applications filed in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed.

In support of this claim, filed herewith are certified copies of said original foreign applications:

Korean Patent Application No. 10-2000-0026379 filed May 17, 2000 and
Korean Patent Application No. 10-2000-0049805 filed August 26, 2000.

Respectfully submitted,



Stephen A. Bent
Attorney for Applicant
Registration No. 29,768

September 13, 2001
Date

FOLEY & LARDNER
Washington Harbour
3000 K Street, N.W., Suite 500
Washington, D.C. 20007-5109
Telephone: (202) 672-5404
Facsimile: (202) 672-5399

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 특허출원 2000년 제 26379 호
Application Number

출원 년 월 일 : 2000년 05월 17일
Date of Application

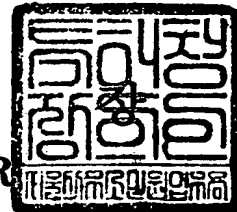
출원인 : (주)바이오니아
Applicant(s)



2001 05 24
 년 월 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2000.05.17
【발명의 명칭】	비만 또는 당뇨병 예방·치료용 미생물 및 상가 미생물이 첨가된 제제
【발명의 영문명칭】	Microorganisms for Corpulence and Diabetes Mellitus, and Medicine or Health Aid Food containing Thereof
【출원인】	
【명칭】	(주)바이오니아
【출원인코드】	1-1998-106377-3
【대리인】	
【성명】	김원준
【대리인코드】	9-1998-000674-0
【포괄위임등록번호】	2000-023834-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	방영배
【성명의 영문표기】	BANG,Yong Bae
【주민등록번호】	700220-1663226
【우편번호】	363-810
【주소】	충청북도 청원군 남이면 척북리 124 (주)바이오니아
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정해중
【성명의 영문표기】	JOUNG,Hea Jung
【주민등록번호】	701013-1559515
【우편번호】	363-810
【주소】	충청북도 청원군 남이면 척북리 124 (주)바이오니아
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김봉철
【성명의 영문표기】	KIM,Bongcheol
【주민등록번호】	710607-1343513

【우편번호】	363-810
【주소】	충청북도 청원군 남이면 척북리 124 (주)바이오니아
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김항래
【성명의 영문표기】	KIM, Hang Rae
【주민등록번호】	730210-1471132
【우편번호】	363-810
【주소】	충청북도 청원군 남이면 척북리 124 (주)바이오니아
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박한오
【성명의 영문표기】	PARK, Han Oh
【주민등록번호】	620516-1066622
【우편번호】	363-810
【주소】	충청북도 청원군 남이면 척북리 124 (주)바이오니아
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	생명공학연구소 유전자은행
【수탁번호】	KCTC0773BP
【수탁일자】	2000.05.03
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	생명공학연구소 유전자은행
【수탁번호】	KCTC0774BP
【수탁일자】	2000.05.03
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 김원준 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	20 면 29,000 원
【가산출원료】	21 면 21,000 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	10 항 429,000 원

【합계】	479,000 원
【감면사유】	중소기업
【감면후 수수료】	239,500 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 미생물기탁증명서_2통 3. 중소기업법시행령 제2조에 의한 중소기업에 해당함을 증명하는 서류 _1통[특허출원 제2000-0013464호에 첨부된 것을 원용함]

【요약서】**【요약】**

본 발명은 장내에 서식하면서 포도당을 소화되지 않는 식이섬유로 만들어 체내로 흡수되는 포도당을 차단함으로써 비만, 당뇨를 예방, 치료할 수 있게 하는 미생물 및 그 용도에 관한 것이다. 본 발명의 미생물은 장내에서 서식하면서 장내로 유입되는 포도당, 자당, 과당 등을 장내 미생물이나 소화효소에 의해 분해되지 않는 식이섬유로 전환시켜 체내로 흡수되는 포도당, 자당, 과당의 양을 줄임으로써 비만, 당뇨를 예방 및 치료할 수 있게 하는 방법의 제공에 관한 것이다.

【대표도】

도 2

【색인어】

포도당, 자당, 과당, 단당류, 이당류, 식이섬유, 미생물, 비만, 당뇨, 예방, 치료, 제제

【명세서】**【발명의 명칭】**

비만 또는 당뇨병 예방·치료용 미생물 및 상기 미생물이 첨가된 제제{Microorganisms for Corpulence and Diabetes Mellitus, and Medicine or Health Aid Food containing Thereof}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명에 의한 미생물의 포도당 흡수속도를 보여주는 도표.

도 2는 본 발명에 의한 미생물 섭취시 혈당치의 변화를 보여주는 도표.

도 3은 본 발명에 의한 미생물을 섭취한 비만 마우스의 에너지 대사효율 변화를 보여주는 도표.

도 4는 본 발명에 의한 미생물을 섭취한 마우스의 에너지 대사효율 변화를 보여주는 도표.

도 5는 본 발명에 의한 미생물을 섭취한 마우스의 체중 변화를 보여주는 도표.

도 6은 약물투여로 유도된 비만 마우스의 체중 변화를 보여주는 도표.

도 7은 약물투여로 유도된 비만 마우스의 대사 효율 변화를 보여주는 도표.

도 8은 16S rRNA 염기서열을 바탕으로 한 락토바실러스 균주 BC-Y009의 계통분석도.

도 9는 16S rRNA 염기서열을 바탕으로 한 아세트박터 균주 BC-Y058의 계통분석도.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <10> 본 발명은 포도당, 자당, 과당 등의 단당류, 이당류를 소화되지 않는식이섬유로 전환시켜 체내로 흡수되는 포도당의 양을 줄임으로써 비만, 당뇨병에 대한 치료 및 예방 효과를 보게 하는 미생물 및 그의 이용방법에 관한 것이다.
- <11> 비만은 아직도 원인이 명확히 밝혀지지 않은 여러 가지 요인들에 의해서 복합적으로 발생하는 만성적인 질환으로 알려져 있다. 비만은 직간접적으로 고혈압, 당뇨, 심혈관 질환, 담석, 골관절염, 수면 무호흡증(sleep apnea), 호흡장애, 자궁내막, 전립선, 유방 및 대장암을 유발하는 요인이 되고 있다.
- <12> 1999년 NIH 보고서(The Evidence Report : Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults, 1999, NIH)에 의하면 미국인 가운데 9,700만이 비만상태에 있으며, 비만과 관련된 질환 중의 하나인 제2형 당뇨(type 2 diabetes mellitus)가 약 1,570만에 이른다. 또한 비만과 관련된 질환으로 매년 20만명이 사망한다고 알려져 있다(Dan Ferber, Science, 283, pp 1423-1424, 1999).
- <13> 비만 예방 또는 치료방법은 크게 식이-운동요법, 수술요법 및 약물요법이 있다. 식이-운동요법은 저칼로리-저지방 식이 및 산소를 소비하는 육체의 활동을 통한 방법인

데, 인내심을 가지고 반복적, 계속적으로 적용해야 하기 때문에 대중적인 효과를 보기는 어려운 것으로 인식되고 있다. 수술요법은 외과적 수술을 통해 체지방을 물리적으로 제거하는 방법으로서 단기간에 효과를 볼 수 있는 장점이 있지만, 수술을 해야하는 점, 효과의 지속성이 없다는 점, 비용이 많이 든다는 점 등 때문에 광범위하게 활용되지는 않고 있다.

<14> 혈당을 감소, 혈당의 흡수를 저해, 인슐린의 작용을 강화 시키거나, 식욕의 감소를 유발하는 약제들에 의해서 비만 내지는 비만형 당뇨를 치료 및 예방하고자 하는 약물요법은 현재 가장 활발한 연구분야이다.

<15> 현재까지 개발된 비만 및 비만형 당뇨의 예방 및 치료를 위한 약제는 다양한 생리학적 메카니즘을 이용하고 있다.

<16> 인슐린의 작용을 증가시키는 약물로서 Sulfonylurea, Metformin, Pioglitazone, Thiazolidinedione유도체 등이 개발되었다. Sulfonylurea는 췌장의 베타세포로부터 인슐린의 분비를 자극하는 작용을 하지만, 부작용으로 혈중의 포도당 농도를 정상이하로 낮추는 저혈당증(hypoglycemia)을 유발할 수 있다.

<17> Metformin는 식이요법이나 운동요법으로 회복되지 않는 인슐린-비의존성 당뇨 환자에 주로 사용된다. 이 약제는 간에서의 당신생(hepatic gluconeogenesis)의 과정을 억제하고, 포도당을 근육과 지방조직에 저장하도록 한다. 구토, 설사 등의 부작용이 있는 것으로 알려져 있다.

<18> Pioglitazone은 일본의 다께다사가 개발한 것으로써, 인슐린의 세포에 대한 감수성을 증가시켜 인슐린의 작용을 강화하는 역할을 한다(Kobayashi M. *et al.*, Diabetes,

41(4), pp 476-483, 1992).

- <19> 체내 지방의 분해 촉진 약물로서는 Beta3-adrenoreceptor 저해제(BRL-35135)가 알려져 있는데, 현재 지방세포에 특이적으로 작용하여 지방세포의 지방을 분해하여 열로 발산시키는 동시에 혈당강하 효과를 나타낸다.
- <20> 지방의 흡수억제 약물로서는 췌장 지방분해효소 방해제(orlistat, Roche 사)가 알려져 있는데, 췌장 지방분해효소의 작용을 억제함으로 지방의 흡수를 감소시키는 약제이나 지용성 비타민의 흡수를 방해하며, 유방암 유발의 가능성이 있다.
- <21> 식욕을 저해하는 약제는 주로 뇌에 존재하는 신경전달물질(catecholamines)에 작용하여 식욕을 저하시킨다. 그러나 Dexfenfluramine, Fenfluramine은 신경독성, 판막성 심장질환의 부작용이 있고, sibutramine은 심박수와 혈압을 상승시키는 부작용이 있다.
- <22> 당 흡수 억제 관련 치료제로서 α -글루코시다제 저해제(Acarbose, Bayer 사), 아밀라제 저해제,식이섬유, 고분자물질 등이 있다. Acarbose는 위장관 내의 미세융모(microvilli)에 존재하는 여러 가지 α -글루코시다제의 작용을 경쟁적으로 억제하는 것으로 알려진 pseudo-oligosaccharide(위과당류)이다. 이를 다량을 섭취하였을 때 설사를 일으킬 수 있다(W. Puls *et al.*, Front. Horm. Res. 2, 235, 1998). 아밀라제 저해제는 탄수화물을 포도당으로 전환시키는 아밀라제의 작용을 억제함으로 과도한 영양분의 섭취로부터 오는 대사불균형을 막기위해 개발되었다(Sanchez-Monge R. *et al*, Eur. J. Biochem., 183, pp 37-40, 1989).
- <23> 식이섬유 섭취는 가장 손쉬운 방법중의 하나로 식물성 섬유가 많은 식이를 통해서 소장에서 영양분의 흡수 효율을 낮추어 식후에 포도당의 상승을 억제할 수 있다. 또한

기존의 식이섬유를 섭취하는 방법은 소화되지 않는 식이섬유 자체를 섭취함으로써 섭취할 수 있는 식사량을 줄여 비만억제 효과를 얻게 된다. 식이섬유는 생산을 위한 설비투자 및 인력이 많이 요구되고 생산성 또한 그리 높지 않은 문제가 있다.

<24> 고분자물질로서는 Isomaltotriose, Dextran 및 Pullulan 을 들 수 있는데, 이들 폴리머는 당을 섭취한 후에 혈당의 증가를 억제시키기는 하지만 부작용이 심하다. 예를 들면 dextran은 혈액의 응고시간(blood coagulation time)을 지연시킴으로 과다출혈을 유발할 수 있다.

<25> 상기와 같은 다양한 약제들 중에서 인체의 대사균형에 손상을 주지 않으며, 천연물질이라는 점에서 식이섬유가 가장 유용한 비만 예방·치료제제로 인정되고 있다.

<26> 미생물에 의해 생산되는 식이섬유인 미생물 식이섬유는 다수의 박테리아 예를 들면, 글루코노박터 속(*Gluconobacter* sp.), 아그로박테리움 속(*Agrobacterium* sp.), 아세토박터 자일리눔(*Acetobacter xylinum*), 아세토박터 한세니(*A. hansenii*), 아세토박터 파스테리아누스(*A. pasteurianus*), 아세토박터 아세티(*A. acetii*), 라이조븀 속(*Rhizobium*), 알칼리게네스 속(*Alcaligenes*), 살리나 속(*Sarcina*), 스트렙토코커스 써모필루스(*Streptococcus thermophilus*), 락토코커스 크레모리스(*Lactococcus cremoris*), 락토바실러스 헬베티쿠스(*Lactobacillus helveticus*), 락토바실러스 불가리쿠스(*L. bulgaricus*), 락토바실러스 사케(*L. sake*), 락토바실러스 류테리(*L. reuteri*), 락토바실러스 락티스(*L. lactis*), 락토바실러스 델브뤼키의 아종(*L. delbrueckii* subsp.), 락토바실러스 헬베티쿠스글루코스의 변종(

L. helveticusglucose var. jugurti), 류코노스톡 텍스트라니쿰(), 불가리쿠스 속(*Bulgaricus*), 캄페스트리스 속(*Campestris*), 스펡고모나스 속(*Sphingomonas*) 등에 의해 만들어지고 있다.

<27> 이들이 생성하는식이섬유는 각종 식품의 안정제, 증점제, 유화제, 흡습제 등과 의학, 화장품 소재로 사용이 되고 있다. 현재 미생물 cellulose, xanthan, acetan 등과 해조류에서 정제한 식이섬유인 Guar gum, Locust bean gum, carrageenan, alginate, agar 등이 상품화되어 다양하게 활용되고 있다.

<28> 이중 락토바실러스 속의 균주는 인체에 서식하는 정상 미생물 군집(normal microbial flora)의 주요 구성원으로서 건강한 소화기관과 질내 환경을 유지하는 데 있어서 중요성이 오래 전부터 알려져 왔다.(Bibel, D. J., ASM News, 54:661-665, 1988; Reid, G. and A. W. Bruce, In H. Lappin-Scott (ed.), Bacterial biofilms. Cambridge University Press, Cambridge, England, p. 274-281, 1995; Reid G., A. W. Bruce, J. A. McGroarty, K. J. Cheng, and J. W. Costerton, Clin. Microbiol. Rev., 3:335-344, 1990) 일반적으로 락토바실러스 균주의 서식처는 동물의 소화기관 (*L. acidophilus*, *L. intestinalis*, *L. johnsonii*, *L. reuteri* 등), 질내 점막 (*L. vaginalis*, *L. gasseri*), 식품(wine - *L. hilgardii*; 유산균 음료 - *L. kefir*, *L. kefiranoferiens*; cheese - *L. casei*, 식초- *L. acetotolerans*; 구강- *L. oris*; 누룩- *L. sake*, *L. homohiochi*; fruit juice - *L. kunkeei*, *L. mali*, *L. suebicus*; 발효된 소시지 또는 어류-*L. farciminis*, *L. alimentarius*) 등이다.

<29> 실제로 많은 사람들이 건강한 장을 유지하고 때로는 요로질내 감염(urogenital tract infection)을 막기위한 방법으로 락토바실러스 속의 균주를 함유한 건강 보조제를

사용하고 있다. 최근에는 설사나 변비 예방 또는 요로 감염의 예방 외에 락토바실러스의 다양한 생리활성 기능(probiotic activity), 즉, 면역력의 조절, 혈중 콜레스테롤 수치 조절, 류마티즘의 치료, 암의 예방, 유당에 대한 민감성 완화, 아토피성 피부염에 대한 효과 등에 대한 중요성과 관심이 증가하고 있다.

<30> 미국 공중건강 가이드라인(U.S. Public Health Service guidelines)에 의하면 현재 미국 균주기탁기관(ATCC, Maryland, USA)에 기탁된 262개 락토바실러스 균주 모두 인체나 동물에 질병을 유발할 잠재적 위험에 대해서 알려진 것이 없다고 인정하는 안전수준(Biosafety Level) 1로 분류되어 있다. 60 여개의 락토바실러스 속에 속하는 균주중에서 독성을 지닌 것으로 알려진 것은 없다.

<31> 최근의 락토바실러스가 합성하는 세포외 식이섬유에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 이들 균주가 세포외 식이섬유를 만드는 기작에는 많은 유전자가 관여하기 때문에 아주 복잡하며 합성되는 식이섬유의 양 또한 매우 적은 것으로 알려져 있다.(Int. J. Food Microbiol., Mar 3 40:1-2, 87-92, 1998; Current Opinion in Biotechnology, 10:498-504, 1999; Current Opinion in Microbiology, 2:598-603, 1999; Appl. Environ. Microbiol., Feb 64:2, 659-64, 1998; FEMS Microbiol. Rev., Apr 23:2 153-77, 1999; FEMS Microbiol. Rev., Sep 7:1-2, 113-30, 1990)

<32> 또한 아세트박터(*Acetobacter* sp.)는 식이성 셀룰로오스 식이섬유를 합성하는 미생물로 잘 알려져 있는데, 이들의 셀룰로오스 합성에 대해서는 많은 연구가 되어 있다.(Aloni Y., Cohen R., Benziman M., Delmer D, J Biological Chemistry, 258:4419-4423, 1983; Amikam, Benziman M., Journal of Bacteriology, 171:6649-6655,

1989; Aschner M., J Bacteriology, 33:249-252, 1937; Benziman M., Burger-Rachamimov H., J Bacteriology, 84:625-630, 1962; Brown AM, Journal of Polymer Science, 59:155-169, 1962; Brown AM, Gascoigne JA, Nature, 187:1010-1012, 1960; Colvin JR, Planta, 149:97-107, 1980; Delmer DP, Amor Y., Plant Cell, 7:987-1000, 1995; Delmer DP, Benziman M., Padan E., PNAS USA, 79:5282-5286, 1982; Delmer DP, Brown RM Jr., Cooper JB, Lin FC, Science, 230:822-825, 1985)

<33> 아세토박터는 편성 호기성(strict aerobe)이지만 극미량의 산소존재 조건하에서도 생육할 수 있는 특성을 가지고 있고, 산소가 적게 존재하는 조건에서는 스스로 셀룰로오스식이섬유를 합성하여 부유하여 산소를 공급 받으려는 성질을 가지고 있다. 포도당을 셀룰로오스식이섬유로 전환시키는 양과 속도에 관한 연구(Brown *et al.*; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol73(12), 4565-4569)에 의하면 약400amol/cell/hr속도로 포도당을 셀룰로오스로 전환 시킨다고 한다. 이는 4×10^{15} cells이면 한시간에 약 200g의 포도당을 셀룰로오스식이섬유로 전환 시킬 수 있는 속도이다.

<34> 일반적으로 아세토박터가 자당을 대사한다고 보고된 경우가 드물지만 자연계에는 자당을 포도당으로 전환시킬 수 있는 아세토박터가 존재한다(PNAS, 96: pp 14-18, 1999). 현재 미국 FDA에는 아세토박터 자일리눔(*Acetobacter xylinum*)은 초산과 솔보스(sorbose)를 합성하는 용도로 승인이 되어있고, GRAS(Generally Accepted As Safe)로 승인 되어있다.

<35> 상기한 바와 같이 현재까지 비만, 당뇨치료에 관한 많은 연구와 노력이 있었지만 아직까지 그 결과가 미미한 수준이다. 상기 언급된 수 많은 화합물들이 비만, 당뇨병 치료제로 개발되고 있지만 부작용이 발생하고 이미 체내에 축적된 체지방, 단백질 등을 강제적으로 배출되게 하는 기작이기 때문에 비만, 당뇨를 원천적으로 억제하거나 치료하는 획기적인 치료제는 아직까지 없는 실정이다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<36> 본 발명의 목적은 장내에 생육하면서 장내 소화효소에 의해 분해된 탄수화물을 경쟁적으로 흡수하여 소화되지 않는 식이섬유로 변환시킴으로써 체내로 흡수되는 포도당의 양을 줄일 수 있는 미생물을 제공하는 것이다.

<37> 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 미생물을 생균상태로 섭취함으로써 체내로 흡수되는 당류의 양을 원천적으로 줄이게 되는 비만 및 당뇨병 예방·치료 제제를 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<38> 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명은, 인간의 장내에서 생장이 가능하며, 당류를 이용하여 소화되지 않는 식이섬유를 합성하는 것을 특징으로 하는 비만 또는 당뇨병 예방·치료용 미생물에 관한 것이다.

<39> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 상기 미생물이 생균형태로 첨가된 것을 특징으로 하는 비만 및 당뇨병 예방·치료용 제제를 제공한다.

- <40> 본 발명에 의한 미생물은 장내에서 생장이 가능하고, 인체에 무해하며, 당류를 소화되지 않는식이섬유로 변환시키는 아세트박터 속, 글루코노박터 속, 락토바실러스 속 또는 아그로박테리움 속에 속하는 균주인 것이 바람직하다.
- <41> 구체적으로 예를 들면, 아세트박터 자일리눔(*Acetobacter xylinum*), 아세트박터 한세니(*A. hansenii*), 아세트박터 파스테리아누스(*A. pasteurianus*), 아세트박터 아세티(*A. aceti*), 락토코커스 크레모리스(*Lactococcus cremoris*), 락토바실러스 헬베티쿠스(*Lactobacillus helveticus*), 락토바실러스 불가리쿠스(*L. bulgaricus*), 락토바실러스 사케(*L. sake*), 락토바실러스 류테리(*L. reuteri*), 락토바실러스 락티스(*L. lactis*), 락토바실러스 델브뤼키의 아종(*L. delbrueckii* subsp.), 락토바실러스 헬베티쿠스글루코스의 변종(*L. helveticusglucose var. jugurti*) 등이 본 발명에 의한 미생물에 해당될 수 있다.
- <42> 본 발명에 의한 미생물은 락토바실러스 속 BC-Y009(KCTC0774BP) 균주와 아세트박터 속 BC-Y058(KCTC0773BP) 균주인 것이 특히 바람직하다.
- <43> 본 발명에 의한 균주들은 종래 알려진 통상의 방법에 따라 적절하게 액상화하거나, 부형제와 혼합하거나, 건조시켜 캡슐에 담거나, 점착제와 혼합하는 방법으로 액상제제, 분말제제, 캡슐제제 또는 정제를 제조할 수 있다. 본 발명에서 '제제'란 반드시 의약품으로 인정된 것만을 의미하는 것은 아니고 통상적인 기능성 식품 또는 건강식품까지 포함하는 개념이다.

<44> 이들 제제를 주기적으로 복용하는 경우 장내에 본 발명에 의한 미생물들이 균총을 이루면서 인체가 당류를 흡수하는 것을 경쟁적으로 방해할 뿐 아니라 미생물이 생성한 비소화성 식이섬유가 장내 유용균의 생육조건을 좋게 하고 장운동을 자극함으로써 결국 비만 또는 당뇨의 예방 및 치료제로 활용되는 것이다.

<45> 이하 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

<46> 본 발명에 의한 비만 또는 당뇨의 예방·치료용도의 미생물은 ① 장내에서 증식이 가능하며 ② 저당류를 빠르게 흡수하여 비소화성 또는 난소화성 식이섬유로 전환시키고 ③ 인체 또는 가축에 해가 없다는 조건을 만족하여야 한다. 따라서 이들은 종래 각종의 연구결과를 검색하고 상기 조건에 해당되는 미생물을 각종 기탁기관에서 분양받을 수도 있으며, 상기 조건을 만족하는 신규의 미생물을 분리동정할 수도 있는 것이다.

<47> 본 발명자들은 먼저 신규의 미생물을 다음과 같은 방법으로 분리동정하였다.

<48> 한국 각지의 제당공장 하수와 그 밖의 다양한 지역으로부터 채취한 샘플을 시클로헥시미드가 함유된 MRS 한천배지 및 BHS 한천배지에 접종하여 배양한다. 생성된 콜로니를 MRS 및 BHS 액체배지에 접종하여 정치배양하여 배지 상층에 매트릭스 형태의 막 또는 캡슐 형태의 막을 생성하는 균주를 선발한다. 형성된 막을 분리하고 장내 소화효소로 분해되는 지 여부를 확인하여 비소화성(또는 난소화성) 고분자물질을 생성하는 것을 확인하였다. 이중 특히 세포외 다당류(식이섬유)를 다량 생성하는 균주 BC-Y009, BC-Y058을 분리하였다.

<49> BC-Y009 및 BC-Y058균주에 대한 형태학적 관찰과 16S rRNA의 부분 염기서열의 유사

성을 비교한 결과 각각 락토바실러스 및 아세토박터와 높은 유사성 보인 바, 표현형 (phenotype)과 16S rRNA 염기서열 분석을 바탕으로 균주 BC-Y009는 신규한 락토바실러스 속에, BC-Y058균주는 신규한 아세토박터 속에 속하는 균주인 것으로 동정되었다.

<50> 본 발명의 락토바실러스 BC-Y009와 아세토박터 BC-Y058를 비만과 당뇨병을 유발하는 마우스에 투여하는 경우 마우스의 혈당치는 투여 전에 비해 약 70% 정도로 감소되는 반면에 정상 마우스의 경우 혈당치의 감소는 미미하였다. 이에 의해 본 발명에 의한 미생물이 당뇨병 치료 및 예방을 위한 혈당치 감소에 효과가 있으며 정상인체에 적용되더라도 종래 다른 약제와는 달리 저혈당 이라는 부작용이 발생하지 않음을 알 수 있다.

<51> 비만-당뇨를 유발하는 마우스에 본 발명에 의한 균주 BC-Y009, BC-Y058를 투여하면 정상 마우스에 비하여 사료 섭취량이 17~24%까지 증가되나, 사료섭취대비 몸무게 증가 효율이 상당량 감소한다. 이는 본 발명에 의한 미생물 제제를 인간이 섭취하는 경우 식욕에 맞게 충분히 음식물을 섭취하더라도 비만이나 당뇨의 우려가 적어짐을 의미한다.

<52> 혈청 지질량 또한 본 발명에 의한 미생물을 섭취하는 경우 그렇지 않은 군 보다 적게 나타나, 본 발명에 의한 미생물 및 미생물 제제가 비만, 당뇨 및 순환기성 질병(동맥경화, 심근경색 등)에 효과가 있음을 알 수 있다. 나아가 일반 마우스의 경우에는 미생물제제를 투여시킨 군이 식이를 약간 더 많이 하여 비투여군에 비하여 에너지 효율이 다소 감소되는 결과를 보였으나, 지질 함량의 변화는 거의 볼 수 없는 등 정상 마우스에서 제제 투여에 따른 부작용이 발생하지 아니하였다.

<53> 이하, 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명한다.

<54> 실시예 1 : 토양 시료로부터 세포외 다당류를 생성하는 미생물 선별

<55> 식이섬유를 생성하는 미생물을 분리하기 위해 제당공장 하수와 그 밖의 다양한 지역에서 채취한 시료 10g씩을 취해 잘게 부순 다음 생리식염수(0.85% NaCl) 90 ml에 분산시켰다. 이 분산액을 생리식염수로 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} 희석한 다음 이들 희석액을 100 ml 당 1 mg의 시클로헥시미드(cycloheximide)를 함유한 MRS(1% Peptone, 1% 쇠고기 추출물, 0.5% 효모추출물, 2% 포도당, 0.1% Tween-80, 0.2% ammonium citrate, 0.5% sodium acetate, 0.01% $MgSO_4$ 0.005% $MnSO_4$, 0.2% disodium phosphate, pH6.5)한천배지와 BSH(2% 포도당, 0.5% 펩톤, 0.5% 효모추출물, 0.27% Na_2HPO_4 , 0.115% 구연산, pH5.0)(Hestirin and Schramm, J. Gen. Microbiol., 11:123, 1954)한천배지에 도말하여 30℃에서 72시간동안 배양하였다.

<56> 이렇게 하여 얻어진 약 2,000 콜로니를 1차로 5ml MRS액체배지와 BSH액체배지에 접종한 다음 30℃에서 72시간 정치배양하여 액체배지 상층에 매트릭스 형태의 막을 생성하는 균주와, 액체배지가 투명하면서 캡슐모양의 세포외 다당류를 형성하는 균주를 선별하고 2차로 5 ml MRS액체배지와 BSH 액체배지에 접종하여 30℃에서 교반하고 600 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도가 0.2가 되도록 BSH 액체배지로 희석한 다음 여기서 10 ml을 취해 100 ml의 BSH 액체배지에 접종하고 30℃에서 72시간동안 정치배양하였다.

<57> 생성된 세포외 식이섬유의 양을 측정하기 위해 각각의 배양액을 4℃, 6,000 rpm에서 원심분리하여 미생물 침전물을 얻었다. 0.1 N NaOH로 균체에 붙어있는 막을 알칼리

용해시킨 다음 80℃에 30분간 정치하고 다시 4℃, 6,000 rpm에서 원심분리하는 과정을 수차례 반복해서 하얀 실타래처럼 엉켜있는 세포외 다당류를 추출하고 동결건조시켜서 그 양을 재었다. 이중 세포외 다당류의 양을 많이 생성한 균주를 선별하여 세포외 다당류 생성량을 비교하였다(표 1).

<58> 【표 1】

세포외 다당류 생성량 비교

선별번호	생성된 세포 외 다당류 양 (건조무게 g / ℓ BSH)
BC-Y 009	3.8
BC-Y 002	4.2
BC-Y 015	3.2
BC-Y 026	4.1
BC-Y 058	4.8
BC-Y 112	3.0
BC-Y 130	3.4
BC-Y 201	3.3

<59> 실시에 2 : 선별된 균주 BC-Y058, BC-Y009의 형태적인 특성 및 동정

<60> 실시에 1 과정에서 선별된 균주 중 다당류 생성량이 많은 BC-Y009, BC-Y002, BC-Y015, BC-Y026, BC-Y058, BC-Y112, BC-Y130, BC-Y201의 부분적인 염기서열을 결정한 결과 락토바실러스와 아세토박터 두 종류의 미생물로 판단되었다.

<61> 이중 식이섬유 생성량이 많은 BC-Y009, BC-Y058을 각기 MRS와 BSH 액체배지에 접종하여 30℃에서 72시간동안 현탁배양하고 배양액을 4℃, 6,000rpm에서 원심분리하여 얻은 미생물을 CTAB/NaCl 방법에 의해 핵산을 추출하였다. 핵산 추출물에 대하여 16S rRNA consensus primer를 이용하여 중합효소연쇄반응법(PCR)에 의해 16S rRNA를 증폭하고 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열을 BLAST 분석(NCBI, USA)을 실시한 결과 락토바실러스 힐가디(

L. hilgardii), 아세트박터 자일리눔(*A. xylinum*), 글루코노박터(*Gluconobacter* sp.)를 비롯한 다수의 락토바실러스 종, 아세트박터 종과 높은 염기서열 유사성을 보였다(표 2 및 표 3).

<62> 【표 2】

락토바실러스 (*Lactobacillus* sp.) BC-Y 009 의 16S rRNA 염기서열 유사성비교

	BC-Y009	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Delbrueckii</i> ATCC 9649	<i>L. helveticus</i> NCDO 2712 T	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	<i>L. hilgardii</i> NCDO 264	<i>Lactobacillus</i> sp. (<i>vermiformis</i>) ATCC 13133
BC-Y009	---	145	136	146	3	4
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Delbrueckii</i> ATCC 9649	88.93	---	76	73	142	143
<i>L. helveticus</i> NCDO 2712 T	89.16	93.94	---	21	134	134
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	88.85	94.43	98.33	---	144	144
<i>L. hilgardii</i> NCDO 264	99.77	89.07	89.26	88.93	---	1
<i>Lactobacillus</i> sp. (<i>vermiformis</i>) ATCC 13133	99.69	88.97	89.21	88.90	99.92	---

비교에 포함된 1400 여개의 염기쌍 (base pair)중에 오른쪽 상단은 차이를 보이는 염기쌍수, 왼쪽 하단은 유사성을 백분율로 표기

<63> 【표 3】

아세트박터(*Acetobacter* sp.) BC-Y058 의 16S rDNA 염기서열 유사성비교

	BC-Y058	<i>A. diazotrophicus</i>	<i>A. liqfaciens</i>	<i>A. hansenii</i>	<i>A. xylinum</i>	<i>A. europaeus</i>
BC-Y058	---	37	34	10	13	14
<i>A. diazotrophicus</i>	97.20	---	17	37	35	36
<i>A. liqfaciens</i>	97.42	98.71	---	34	32	33
<i>A. hansenii</i>	99.24	97.20	97.42	---	15	16
<i>A. xylinum</i>	99.02	97.35	97.58	98.86	---	3
<i>A. europaeus</i>	98.94	97.27	97.50	98.79	99.77	---

비교에 포함된 1320 여개의 염기쌍 (base pair)중에 오른쪽 상단은 차이를 보이는 염기쌍수, 왼쪽 하단은 유사성을 백분율로 표기

<64> 균주 BC-Y009는 그람 양성이고 비운동성(immotile)인 짧은 막대기 모양의 세균으로서 크기는 0.5-3.0 μm 이다. 포자는 형성하지 않으며 통성 혐기성이고, 생육 온도는 20℃-37℃, pH 2.0-8.0 범위에서 자랄 수 있으며, 최적 pH범위는 4.0-7.0이다. 우유 응고성, 카탈라제 음성을 나타내었고, 완전배지(complex medium)에서 백색 콜로니를 형성하였다. MRS액체배지와 BSH액체배지에서 하얀 캡슐모양으로 액체배지 하층에 가라앉으며, 액체배지의 탁도는 맑고 투명한 배지상태에서 식이섬유가 형성되며 액체배지를 흔들면 작게 부서지는 특성을 보였다.

<65> 균주 BC-Y058은 그람음성인 간균모양으로 0.6 x 0.8 μm 의 단일 또는 쌍을 이룬 상태로 존재하였으며, 운동성이 없고 포자를 생성하지 않았다. 생육이 느려 5-7일간 배양해야 하며, 콜로니는 작고 딱딱하고 액체배지에서는 투명한 셀룰로오스 펠리클을 형성하였다. 에탄올, 초산, 젖산을 기질로 사용할 수 있고, 카탈라제 양성반응을 보였다. 포도당을 이용하여 산을 생성하며, 호이어배지에서는 생육하지 못하였다.

<66> 이상과 같이 표현형과 16S rRNA 염기서열 분석을 바탕으로 균주 BC-Y009를 락토바실러스(*Lactobacillus* sp.)BC-Y009로, 균주 BC-Y058를 아세토박터 (*Acetobacter* sp.)BC-Y058로 각각 명명하여 2000년 5월 3일 국제기탁기관인 유전자 은행 부설 KCTC에 기탁번호 KCTC0774BP 및 KCTC0773BP으로 기탁하였다. 도 8 과도 9 에 이들의 계통도를 나타내었다.

<67> 실시예 3 : 식이섬유의 장내 소화효소에 의한 분해성

<68> 상기 미생물에 의해서 장내에서 만들어진 식이섬유가 장내 소화효소에 의해 분해되

는지 보기위해 amylase, lipase, protease, nuclease 등을 함유하며 3 % S.P 활성도를 가지고있는 porcine pancreatin(Sigma, USA) 1 g을 식이섬유 건량 1 g이 용해된 수용액 (pH7.5)에 가해 현탁하고 40℃에서 7일간 배양하면서 1일 1회 반응액을 취해 DNS당 정량을 하여본 결과 전혀 분해되지 않았다(도시 생략).

<69> 따라서 본 발명의 미생물에 의해 생성된 식이섬유는 장내에서 분해되지 않음을 알 수 있었다.

<70> 실시예 4 : 포도당 흡수속도

<71> 생리활성 박테리아(probiotics)로 사용되고 있는 균주로서 락토바실러스 아시도필러스(*L. acidophilus* KCTC3140), 락토바실러스 힐가디(*L. hilgardii* KCTC3500)와 함께 상기 락토바실러스 BC-Y009, 아세트박터 BC-Y002, 아세트박터 BC-Y058 및 대장균(*E. coli*)에 대하여 *in vitro*에서 포도당 흡수속도를 측정하여 그 결과를 도 1과 표 4에 나타내었다.

<72> 도 및 표에서 볼 수 있는 바와 같이 본 발명에 의한 균주들은 다른 젖산균에 비해 포도당 흡수속도가 월등히 우수함을 알 수 있었다.

<73>

【표 4】

단위 시간 단위 O.D 의 균수에 의해서 감소된 글루코스 농도				
	초기 O.D.600nm	최초 Glucose 농도(mM)	1 시간후 Glucose 농도 (mM)	단위시간, 단위O.D.에서 감소된 Glucose 농도 (mM/hr/O.D.)
<i>E.coli</i>	3.0±0.1	110	85±0.5	8.3±0.44
BC-Y009	3.0±0.2	110	50±0.3	20±1.5
BC-Y002	3.0±0.1	110	30±0.7	26.6±1.1
BC-Y058	3.0±0.2	110	38.6±0.3	23.8±0.1
KCTC3500	3.0±0.2	110	67.2±0.3	14.2±0.4
KCTC3140	3.0±0.1	110	65.2±0.4	14.4±0.1

<74> 실시에 5 : 미생물 함유 사료 섭취 후 장내의 장관별 미생물농도와 생존성

<75> 비만과 당뇨병을 유발하는 마우스인 C57BL/6J *Lep^{ob} ob/ob* (이하 'OB 마우스'라 함)를 18시간동안 절식시키고 락토바실러스 BC-Y009, 아세트박터 BC-Y058를 1%(w/w, 건조중량) 함유한 사료(사료 중의 미생물 수는 1.0×10^{13} CFU/g)를 7일간 먹인 후 상기 미생물이 첨가되지 않은 사료를 7일간 먹인 상태에서 십이지장, 공장, 대장에서의 균 밀도를 조사하였다.

<76> 락토바실러스 균수를 측정하기 위해서 락토바실러스를 사료에 섞여 먹인 군의 대조군의 십이지장, 공장, 대장을 떼어내 표면을 생리식염수로 수세한 다음 각 기관의 내용물을 생리식염수에 분산시킨 후 MRS한천배지에 도말하여 37℃에 정치배양하였다. 3일 후에 플락(floc)형성의 유무로 균 수를 세고 대조군에서의 락토바실러스 균수를 차감하여 균체증감을 판단하였다(표 5).

<77> 아세트박터 존재 유무는 마우스의 각 기관을 떼어내고 생리식염수로 기관의 외부를 수세한 다음 내용물을 생리식염수에 분산시킨 후 전기한 BSH액체배지에 접종하고 37℃

에 3일간 배양하였다. 액체배지 상층에 나타난 펠리클(pellicle)막의 형성 유무로 섬유소 생성 균체 존재여부를 판단하였다(표 6).

<78> 표 5와 표 6의 결과로 보아 두 종류의 미생물 모두 마우스의 장내에서 생육이 가능한 것을 알 수 있었다.

<79> 【표 5】

쥐의 십이지장, 공장, 대장의 락토바실러스(<i>Lactobacillus sp.</i>) 분포			
장기	무게(g)	균수 (CFU/g)	막형성 유무
십이지장	0.18±0.03	83±20	
공장	0.29±0.05	1.2× 10 ³ ±50	
대장	0.36±0.07	5.1× 10 ³ ±30	막형성

<80> 【표 6】

쥐의 십이지장, 공장, 대장의 아세트박터(<i>Acetobacter sp.</i>)분포		
장기	무게(g)	막형성 유무
십이지장	0.20±0.02	
공장	0.28±0.04	막형성
대장	0.35±0.03	막형성

<81> 실시예 6 : BC-Y009, BC-Y058 섭취시의 혈당치 변화

<82> (주)삼양사로부터 구입한 마우스 사료 100 g에 국내산 쌀 400 g을 섞어 탄수화물 비율을 약 60%로 구성한 후 이곳에 필요에 따라 건조중량 5 g(1%)의 락토바실러스 BC-Y009 또는 아세트박터 BC-Y058를 가하고 반죽하여 마우스가 섭식하기 가능한 크기의 동결 건조된 경단을 제조하였다. 상기 사료를 물과 함께 마우스에 제공하여 자유로이 섭식하도

록 하였다.

<83> 본 실시예에서 사용된 마우스는 모두 암컷으로 비만과 당뇨병이 유발되는 OB 마우스였으며 균섭취군과 비섭취군을 구분하기 위하여 아세트박터 섭취군(OB-058)과, 락토바실러스 섭취군(OB-009), 비섭취군(균체가 없는 사료를 공급, OB-con)으로 분리 사육하였다. 사육환경은 12시간 간격으로 주기조명(09:00-21:00까지는 조명, 21:00-09:00까지는 차광)을 실시하였고, 온도와 습도는 각각 20-24℃와 40-60%를 유지하였다.

<84> 각 군 마우스의 혈당치를 측정하기 이전에 각각의 마우스를 18시간 절식 시킨 후, 60분 동안 마우스에 충분한 양의 사료를 재공급하였고, 사료를 제거 후 다시 60분이 경과 후에 마우스의 안와정맥총(retroorbital venous plexus)에서 항 응고제가 없는 모세관을 사용하여 혈액을 채취, 혈청을 얻었다.

<85> 혈당치는 효소비색법을 이용한 Trinder kit(Cat. 315-500, Sigma, USA)를 이용하여 분광광도계 505 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준용액을 기준으로 각각의 혈청에 있는 혈당치를 계산하였다. 이렇게 나온 실험결과의 통계적 유의성은 실험군당 평균 ±표준편차로 표시하였고 각 군의 평균치의 통계적 유의성을 ANOVA로 검증하였다($p < 0.02$).

<86> 혈당치 측정 결과를 도 2에 나타낸 바, OB-con군에서는 약 500 mg/dl 정도로 높게 나타나지만, OB-058군의 혈당치는 대조군(정상 C57BL/6J 마우스, 이하 'Lean 군'이라 함)의 혈당 수치와 비슷한 낮은 혈당치를 보이는 것으로 부터, 아세트박터 BC-Y058, 락토바실러스 BC-Y009 투여에 의해 마우스의 혈당치는 각각 약 70%, 53% 정도 감소됨을 알 수 있다(표 7).

<87>

【표 7】

아세트박터 BC-Y058 및 락토바실러스 BC-Y009 투여에 의한 식후 혈당치

	OB-009	OB-058	OB-con
혈당치 (mg/dl)	229±16	141±19	492±60

<88> 실시예 7 : BC-Y058 및 BC-Y009 섭취시 체중과 식이량의 변화 및 그에 따른 대사효율의 변화

<89> 마우스를 OB-058군, OB-009군, OB-con군, Lean-009군, Lean-058군 및 Lean-con군으로 분류하여 군에 따라 아세트박터 BC-Y058과 락토바실러스 BC-Y009를 투여하면서 마우스의 몸무게를 일주일 간격으로 측정하였다. 또한 마우스 체중 변화와 함께 마우스에 의하여 소비된 사료의 무게를 측정하였고 이에 따른 그룹간 대사효율의 변화를 조사하였다.

<90> 마우스의 체중 변화는 유전적 특성이 다른 종간의 체중변화가 분명했으나 유전적 특성이 동일한 그룹에서의 체중변화의 차이는 나타나지 못했다. 표 8에서 볼 수 있는 바와 같이 7주간의 체중변화는 OB 마우스의 경우 아세트박터 BC-Y058 혹은 락토바실러스 BC-Y009 투여 유무에 상관없이 약 47%씩 동일하게 증가하였고, Lean 마우스의 경우 역시 BC-Y058, BC-Y009 투여에 상관없이 체중이 약 27% 증가하였다. 그러나 표 9와 표 10에서 볼 수 있듯이, 군 투여에 따른 사료의 섭취량은 OB 마우스 그룹에서 상대적으로 17~24%정도, Lean 마우스 그룹에서는 약 15~23% 정도 증가하는 것으로 나타났다.

<91> 즉, 본 발명에 의한 미생물 첨가 사료를 섭취하는 경우 사료를 더 많이 섭취하더라도 미생물 미첨가 사료를 섭취하는 경우와 같은 정도의 체중증가를 유발하는 것을 알 수

있었다. 이러한 결과는 아세트박터 BC-Y058 혹은 락토바실러스 BC-Y009에 의해서 식후 혈당치의 상승이 억제됨으로 이에 대한 보상작용으로 더 많은 사료를 섭취하게 된 것으로 판단된다. 이러한 대사효율의 차이는 투여한 BC-Y058 또는 BC-Y009의 포도당 소모와 BC-Y058 혹은 BC-Y009에 의해 생성된 식이섬유의 영향 때문이라고 할 수 있다.

<92> 하기 식에 따라 사료 섭취에 따른 에너지 효율의 변화를 계산하여 표 10에 나타내었다.

<93>
$$\text{에너지대사효율} = \frac{\text{체중변화}(g)}{\text{섭식량}(g)} \times 1,000$$

<94> 표에서 볼 수 있듯이, OB 마우스와 정상 마우스(Lean 마우스) 모두에서 미생물을 투여한 경우 에너지 대사효율이 미생물을 투여하지 않은 경우에 대하여 약 75-85% 선으로 낮게 나타났다(도 3, 도 4).

<95> 【표 8】

마우스 체중의 변화 (g)							n=4
	1	2	3	4	5	6	7
OB-009	21.5±3.21	26.53±2.72	31.52±3.01	34.91±2.5	37.6±2.53	40.1±1.74	41.4±1.47
OB-058	21.95±5.3	26.75±4.60	31.65±2.33	35.8±1.27	38.25±0.78	40.35±0.64	41.25±0.21
OB-con	21.4±2.83	26.3±1.56	31.9±0.99	35.8±2.12	38.35±2.33	40.1±2.69	41.75±3.61
Lean-009	15.7±1.12	17.2±1.19	19.42±0.94	20.1±1.42	20.8±1.12	21.38±1.5	21.5±0.92
Lean-058	13.75±0.07	16.25±0.35	16.75±0.21	17.85±0.21	18.05±0.07	18.85±0.35	19.25±0.78
Lean-con	16.05±1.77	18.5±1.27	20.25±2.05	20.85±1.91	22.15±1.06	21.65±0.78	21.85±2.47

<96>

【표 9】

아세트박터 BC-Y058, 락토바실러스 BC-Y009 투여에 따른 마우스 사료 섭취량의 변화 (g)

	0-16 일	16-21 일	21-34 일	34-41 일	합계
OB-009	146.3	32.4	110.7	38.6	328
OB-058	157.4	34.3	115.3	41	348
OB-con	128.1	34.8	80.3	36.5	279.7
Lean-009	101	20.4	80.5	34.0	235.9
Lean-058	105	19.8	96.3	31.7	252.8
Lean-con	98.9	20.5	56	29.9	205.3

<97> 【표 10】

에너지 대사 효율

	섭식량 (g)	체중변화 (g)	효율	몸무게평균 (g)	몸무게 증가비율
OB-009	328	19.9	121	41.4	0.48
OB-058	348	19.3	111	41.25	0.47
OB-con	279.7	20.35	146	41.75	0.49
Lean-009	235.9	5.8	49	21.5	0.27
Lean-058	252.8	5.5	44	19.25	0.29
Lean-con	205.3	5.8	57	21.85	0.27

<98> 실시예 8 : BC-Y058 또는 BC-Y009 섭취시 비만 마우스의 체중 및 식이량의 변화와 그에 따른 대사효율의 변화

<99> 아세트박터 BC-Y058 및 락토바실러스 BC-Y009를 섭취시키기 이전에 마우스에 비만을 유도하기 위하여 goldthiogluucose(Cat. A-0632, Sigma, USA)를 마리당 1 g/kg씩 주사하였으며 3-4주간의 체중 변화를 측정하여 비만이 유도된 마우스 만을 선별하였다. 실험의 정확성을 위해 체중증가율이 상대적으로 크거나 혹은 작은 마우스는 배제하였다.

<100> 마우스는 암컷으로 C57BL/6J 마우스종을 대상으로 사육 환경 및 조건을 실시예 6에

언급한 방법과 동일하게 적용하였다. 섭취 시키는 군중에 따라 BC-Y058군, KCTC3140군, KCTC3500군, BC-Y009군으로 분류하여 실험하였다.

- <101> 투여한 군에 따른 마우스의 체중 변화를 도 6에 나타내었는데, 아세트박터 BC-Y058, 락토바실러스 BC-Y009를 섭취시켰을 때 체중 증가 비율이 감소되는 양상을 볼 수 있다.
- <102> 또한 표 11과 도 7에서 볼 수 있듯이, 섭취된 당은 소모하지만식이섬유를 생성하지 않는 KCTC3140, KCTC3500의 경우 비만 유도 마우스에서 에너지 효율이 군체를 투여하지 않은 대조군에 비해 높게 나타나 있다. 그러나 식이섬유를 생성하는 BC-Y009 및 BC-Y058을 섭취시킨 마우스 군에 있어서는 상대적으로 적은 에너지 효율을 보이고 있으며, 특히 BC-Y058의 경우 에너지 효율은 대조군에 비하여 55%까지 감소하여 정상 마우스 수준에 근접한 에너지 효율을 보였다(표 12 참조).

<103> 【표 11】

약물투여로 유도된 비만 마우스 대사효율 (g)

	체중변화	섭식량	효율
Carbohydrate	5.43	103.7	52
KCTC3140	6.65	92.4	72
KCTC3500	5.67	102.2	55
BC-Y009	4.38	104.4	42
BC-Y058	2.98	102.7	29

- <104> 실시예 9 : BC-Y058 또는 BC-Y009 섭취시 정상 쥐의 체중 및 식이량의 변화와 그에 따른 대사효율의 변화

- <105> 본 실험에 사용된 마우스는 모두 암컷(female) C57BL/6J 마우스 종으로, 사육 환경

및 조건은 실시예 6에 언급한 방법과 동일하게 적용하였다. 실험에 실시한 마우스는 섭취시키는 군중에 따라 KCTC3500군, KCTC3140군, BC-Y058군, BC-Y009군, 군을 투여하지 않은 대조군으로 나누어 실시예 6과 같이 제조된 사료를 공급하였다.

<106> 투여한 군에 따른 마우스의 체중 변화는 실시예 8과 달리 아세트박터 BC-Y058및 다른 대조 군주를 섭취시켰을 때 체중 증가 비율의 변화는 나타나지 않았으며, 또한 표 12에 나타난 것과 같이 정상 마우스를 대상으로 했을 경우 식이섬유 생성 유무와 관계없이 에너지 효율의 차이점은 크지 않다는 것을 알 수 있다.

<107> 실시예 8과 9에서 볼 수 있듯이 아세트박터 BC-Y058과 락토바실러스 BC-Y009를 섭취시켰을 때 체중 및 식이량의 변화와 그에 따른 대사효율의 변화는 약물 투여로 유도된 비정상적인 비만 마우스에 대해서만 효과를 나타낼 뿐, 정상적인 마우스에서는 변화를 보이지 않았다.

<108> 【표 12】

일반 마우스 대상 에너지 대사효율 (g)

	체중변화	섭식량	효율
Carbohydrate	3.53	132.7	27
KCTC3140	3.10	142.0	22
KCTC3500	3.03	111.5	27
BC-Y009	3.95	129.1	31
BC-Y058	3.48	132.0	26

<109> 실시예 10 : BC-Y058 또는 BC-Y009 섭취시 지방질 분포와 변화

<110> 본 발명에 의한 미생물을 섭취할 경우 혈청 지질, 특히 콜레스테롤의 변화를 분석하여 당뇨와 비만 등의 질병 뿐 아니라 순환기성 질병(동맥경화, 심근경색등)의 감소에

대한 효과가 나타나는지를 확인하였다.

<111> 지방질의 분석은 실시예 6에서와 같이 효소비색법을 이용한 TG-glycezyme-V(榮研化學, 일본), HDL-zyne-V(榮研化學, 일본), Cholestezyme-V(榮研化學, 일본), LDL cholesterol(Cat. 61532, BioMeriux, 프랑스) 등을 이용하여 505-570 nm에서 표준용액과 함께 흡광도를 측정하여 혈청에 있는 각각의 지방질의 양을 계산하였다.

<112> 표 13에서와 같이 사료 투여전 지질함량은 비만 마우스 그룹에서 차이점을 보이지 않았으며 또한 정상 마우스 그룹간에도 차이점을 보이지 않고 있다. 그러나 아세토박터 BC-Y058, 락토바실러스 BC-Y009을 섭취 하였을 때는 표 14에 나타난 것과 같이 7주 후 지질함량의 변화가 발생함을 볼 수 있다.

<113> 미생물을 섭취한 비만마우스의 경우 실험 초기와 비슷한 수준의 지질분포를 유지하고 있음을 알 수 있으나 비섭취군의 경우 혈중내 전반적인 지질함량이 증가하였으나 정상 마우스 경우 미생물 섭취 유무와 상관없이 큰 지질함량의 변화가 보이지 않았다.

<114> 따라서, 아세토박터 BC-Y058 및 락토바실러스 BC-Y009의 섭취는 정상적인 지질 대사에는 영향을 주지 않으며, 오히려 비정상적인 대사 상태의 지질 변화를 막아주어 순환기성 질병(동맥경화, 심근경색 등)의 감소에 효과를 나타낼 수 있음을 예측할 수 있었다.

<115>

【표 13】

사료 투여전 혈중내 지질함량 (mg/dl) n=4

	Total cholesterol	TG	HDL-C	LDL-C
OB-009	*130.22±4.11	98.1±11.4	98.73±9.7	4.18±2.36
OB-058	**129.37±4.24	101.6±10.36	113.52±15.47	3.35±2.08
OB-con	*127.57±4.32	97.13±14.64	96.86±7.61	6.62±2.78
Lean-009	80.46±6.72	80.62±20.5	56.79±8.7	3.35±2.08
Lean-058	78.01±7.97	81±25.40	54.47±1.43	3.35±1.39
Lean-con	76.37±16.94	63.34±14.21	44.2±16.42	4.33±1.39
Lean-chow	82.71±9.30	128.79±23.25	66.75±7.85	1.88±2.08

* P<0.05, ** not significant

TG : Triglyceride

HDL-C : High Density Lipoprotein Cholesterol

LDL-C : Low Density Lipoprotein Cholesterol

<116> 【표 14】

사료 투여후 혈중내 지질함량 (mg/dl) n=4

	Total cholesterol	TG	HDL-C	LDL-C
OB-009	*167.04±1.12	100.76±3.2	157.71±2.4	4.2±2.08
OB-058	**135.25±2.47	98.5±2.83	135±1.41	3.36±1.31
OB-con	*174±1.41	110.5±1.06	165.25±1.06	3.19±0.36
Lean-009	80.44±1.76	67.4±2.71	60.31±2.76	3.78±0.82
Lean-058	82.50±2.12	75.75±1.06	56.75±1.06	4.87±0.95
Lean-con	77.5±2.47	72.75±1.06	25.5±1.41	3.36±0.46
Lean-chow	86.75±0.35	112.25±1.06	76±0.71	3.02±0.46

* P<0.05, ** not significant

TG : Triglyceride

HDL-C : High Density Lipoprotein Cholesterol

LDL-C : Low Density Lipoprotein Cholesterol

【발명의 효과】

<117> 본 발명의 미생물은 체내의 장내에서 생육하면서, 장내 소화효소에 의해 분해된 당류, 이당류 등 여러 탄소화합물을 분해되지 않는 식이섬유로 전환시킴으로서 체내로 흡수되는 탄소화합물의 양을 줄여주고 대사활동에 필요한 에너지는 체내에 축적되어있는 체지방, 단백질을 이용하게 하여 결국 비만, 당뇨를 억제하게 됨은 물론 정상작용, 콜레스테롤 흡수억제, 대장암 예방, 맹장염 예방의 효과가 있을 것으로 기대된다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

인간의 장내에서 생장이 가능하며, 당류를 이용하여 소화되지 않는식이섬유를 합성하는 것을 특징으로 하는 비만 또는 당뇨병 예방·치료용 미생물.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 미생물은 아세토박터 속, 글루코노박터 속, 락토바실러스 속 및 아그로박테리움 속으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 미생물인 것을 특징으로 하는 미생물.

【청구항 3】

제 2 항에 있어서, 상기 미생물은 락토바실러스 속 BC-Y009(KCTC0774BP)와 아세토박터 속 BC-Y058(KCTC0773BP)로 이루어지는 군에서 선택된 미생물인 것을 특징으로 하는 미생물.

【청구항 4】

살아있는 제 1 항에 의한 미생물이 첨가된 것을 특징으로 하는 비만 예방·치료용 제제.

【청구항 5】

살아있는 제 2 항에 의한 미생물이 첨가된 것을 특징으로 하는 비만 예방·치료용 제제.

【청구항 6】

살아있는 제 3 항에 의한 미생물이 첨가된 것을 특징으로 하는 비만 예방·치료용 제제.

【청구항 7】

살아있는 제 1 항에 의한 미생물이 첨가된 것을 특징으로 하는 당뇨병 예방·치료용 제제.

【청구항 8】

살아있는 제 2 항에 의한 미생물이 첨가된 것을 특징으로 하는 당뇨병 예방·치료용 제제.

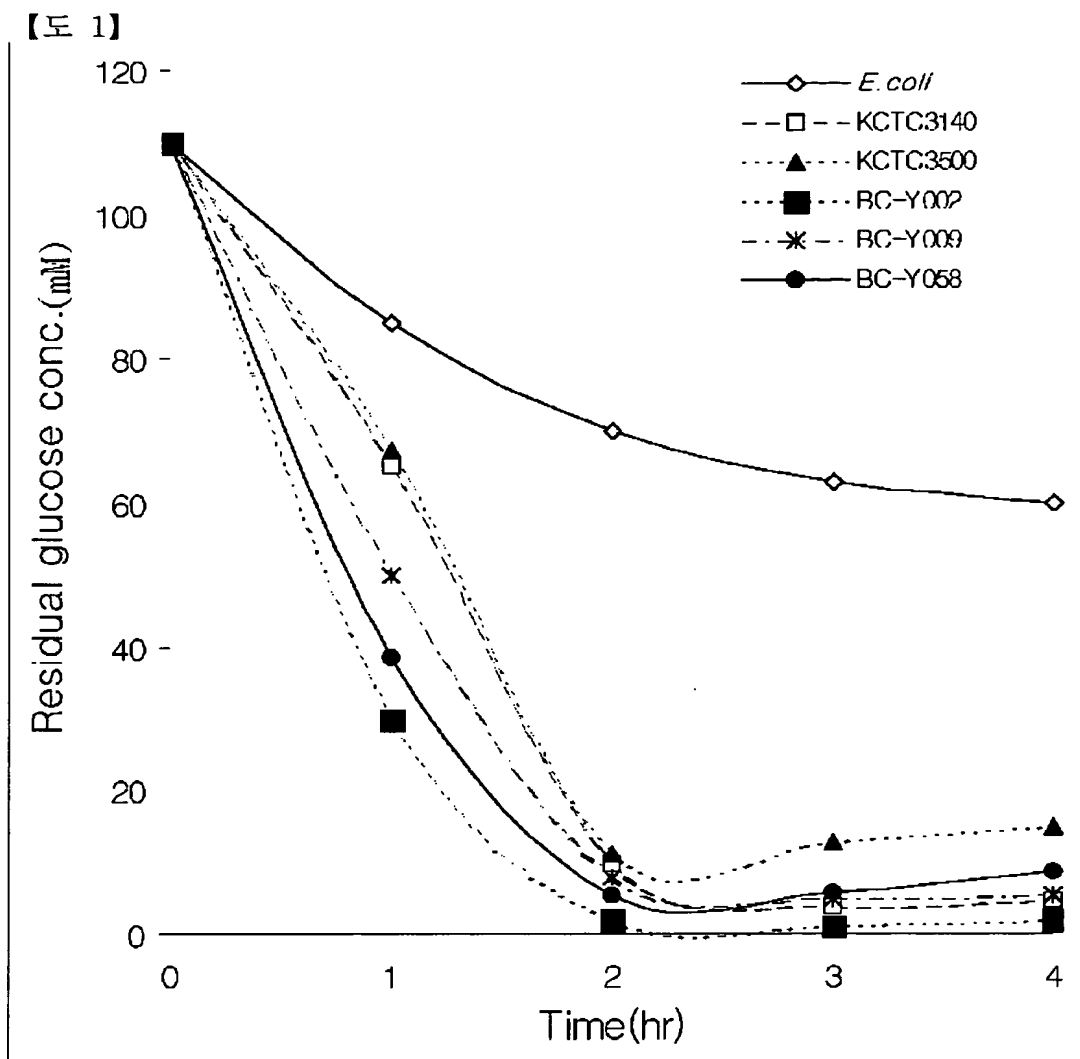
【청구항 9】

살아있는 제 3 항에 의한 미생물이 첨가된 것을 특징으로 하는 당뇨병 예방·치료용 제제.

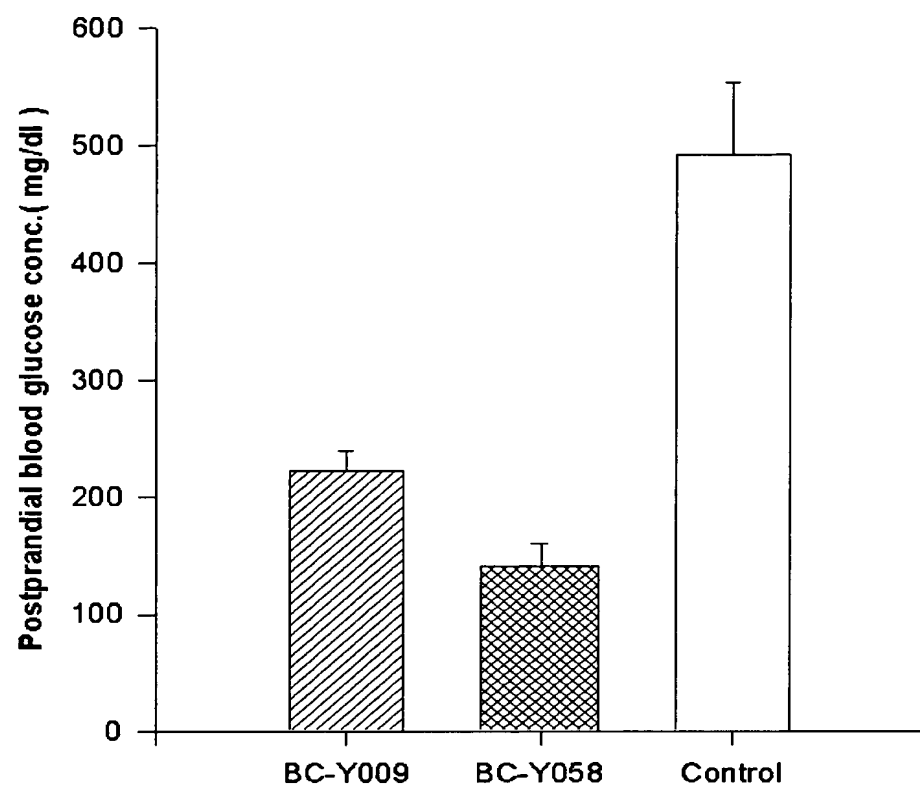
【청구항 10】

제 4 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제제는 분말, 캡슐, 젤, 액, 정제 형태 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 제제.

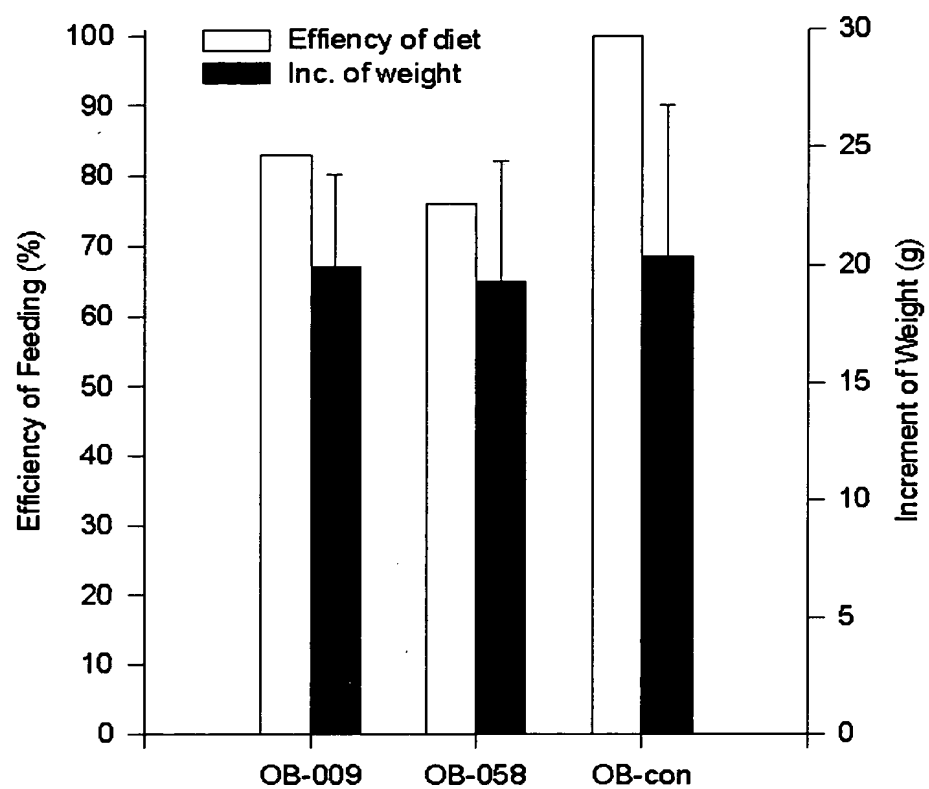
【도면】



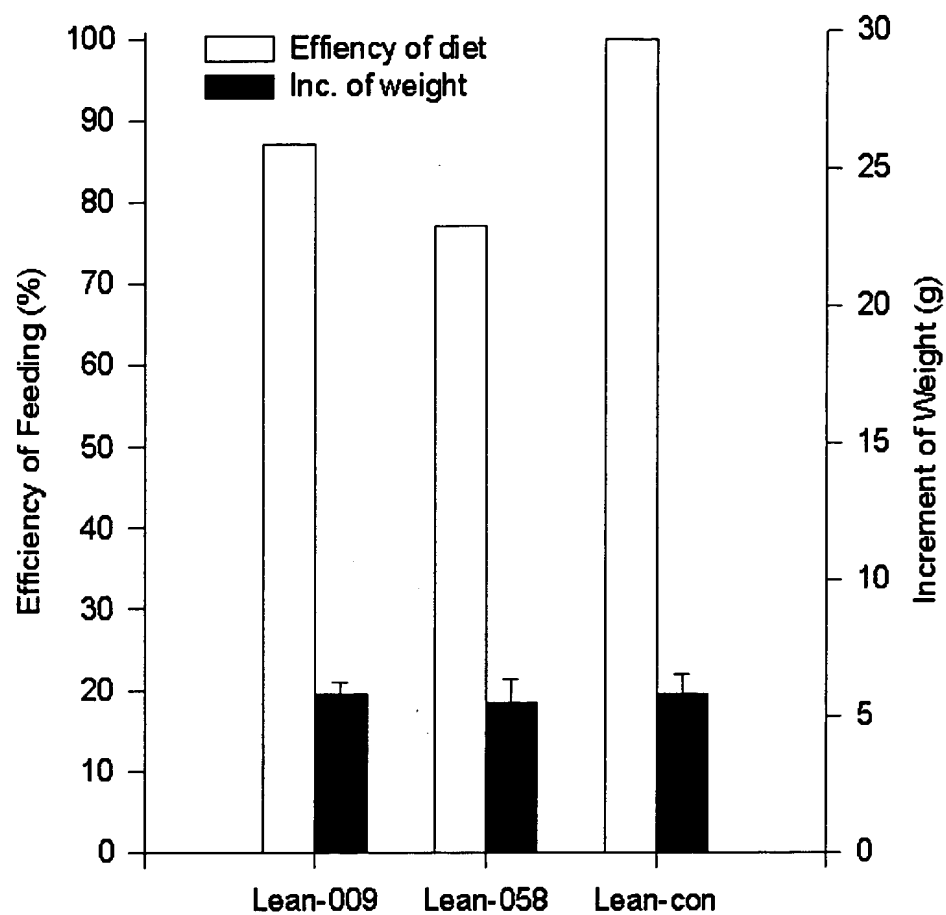
【도 2】



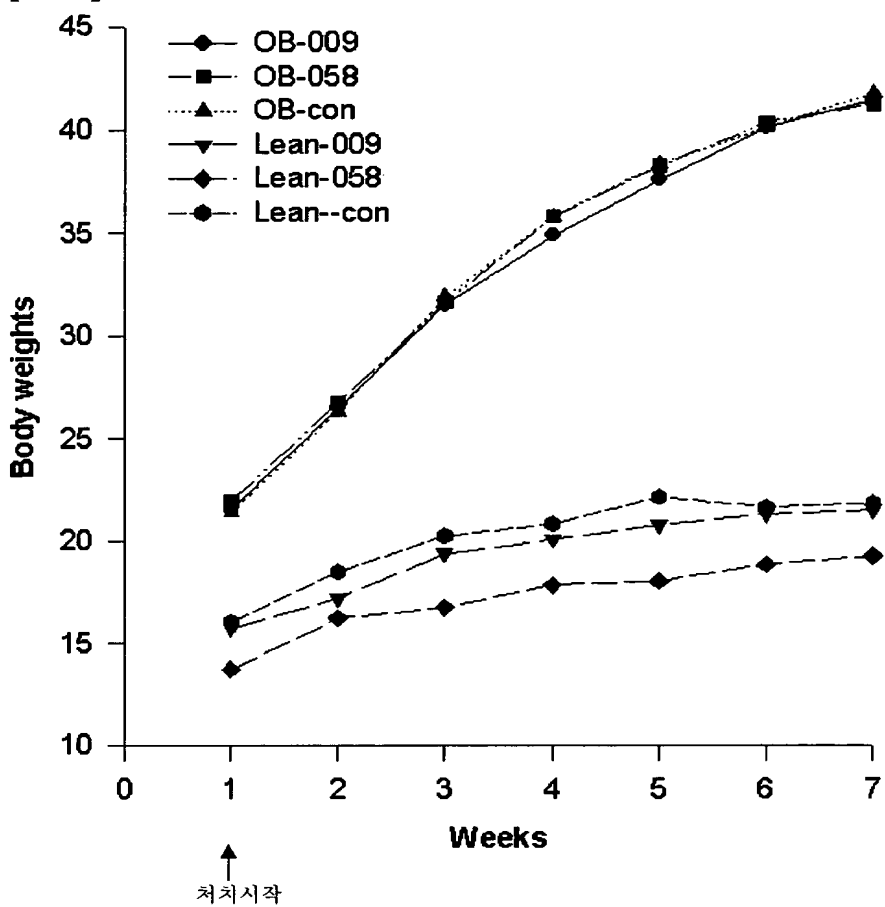
【도 3】



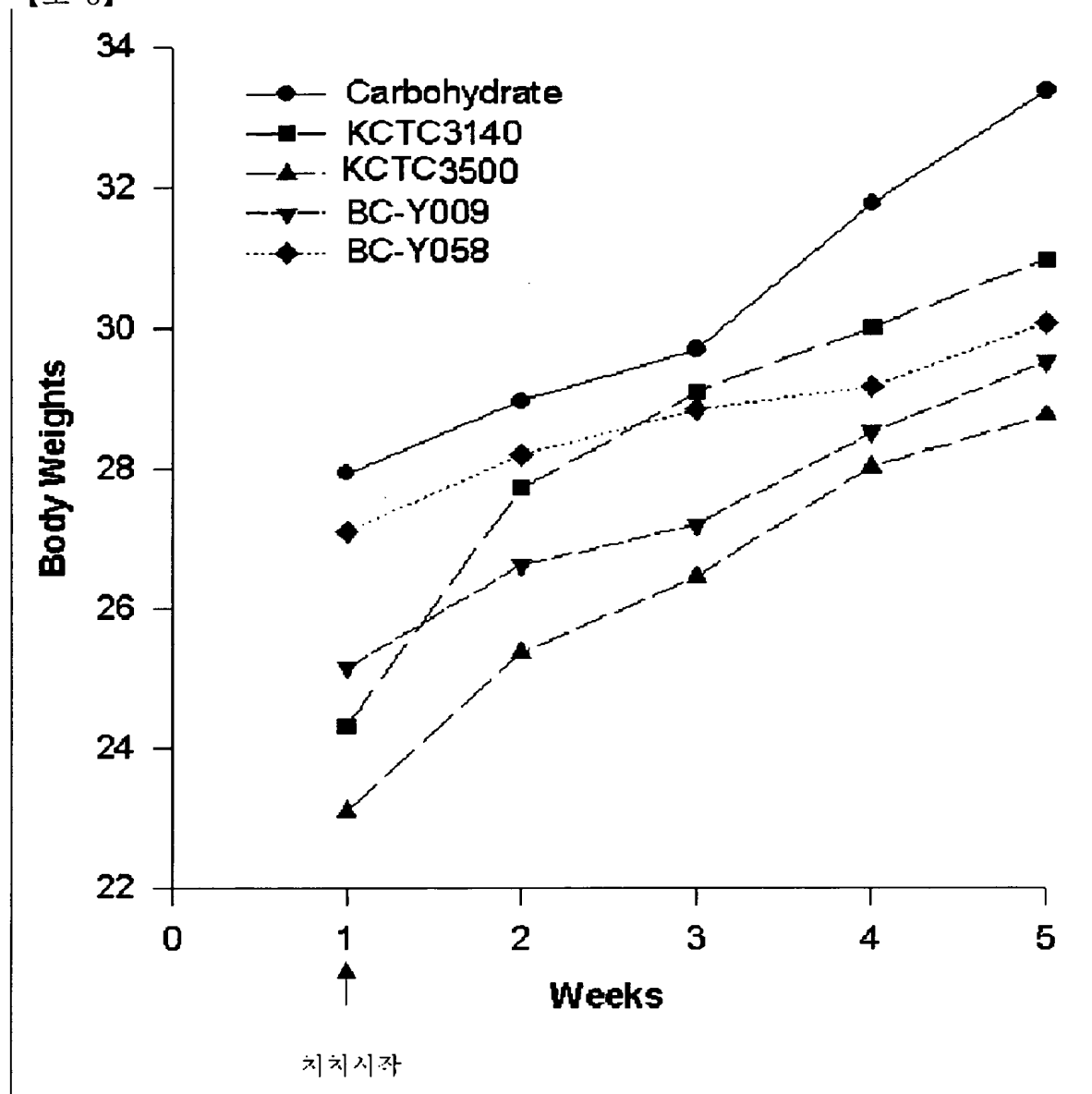
【도 4】



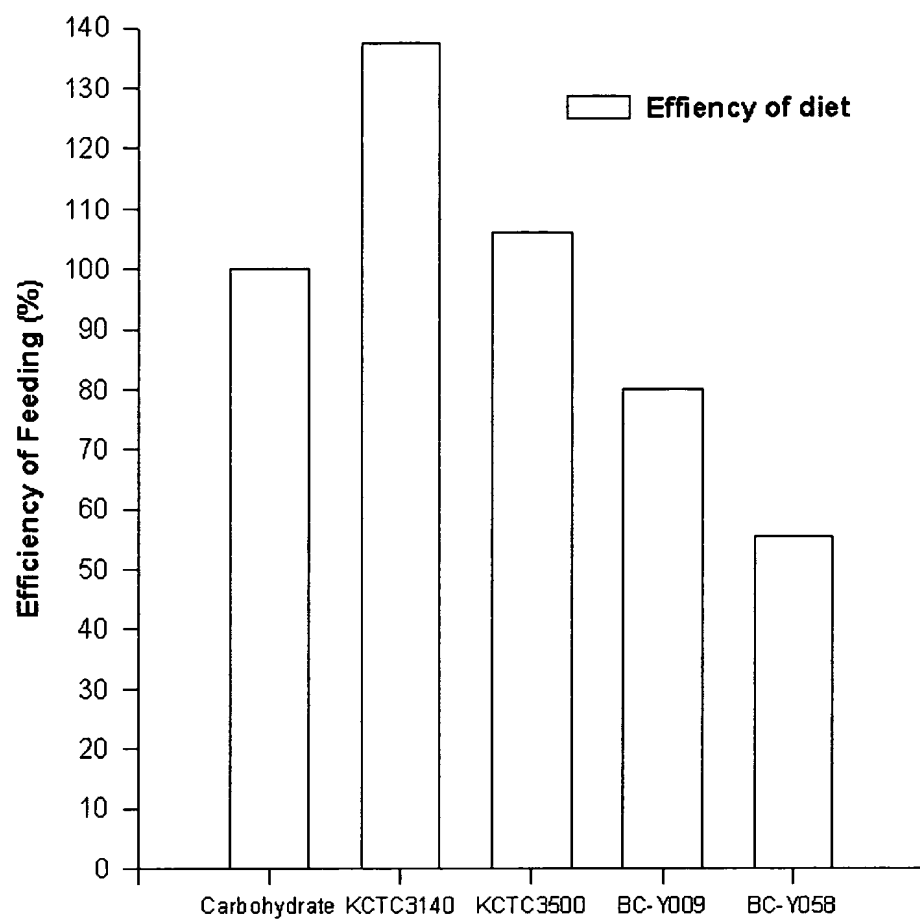
【도 5】



【도 6】

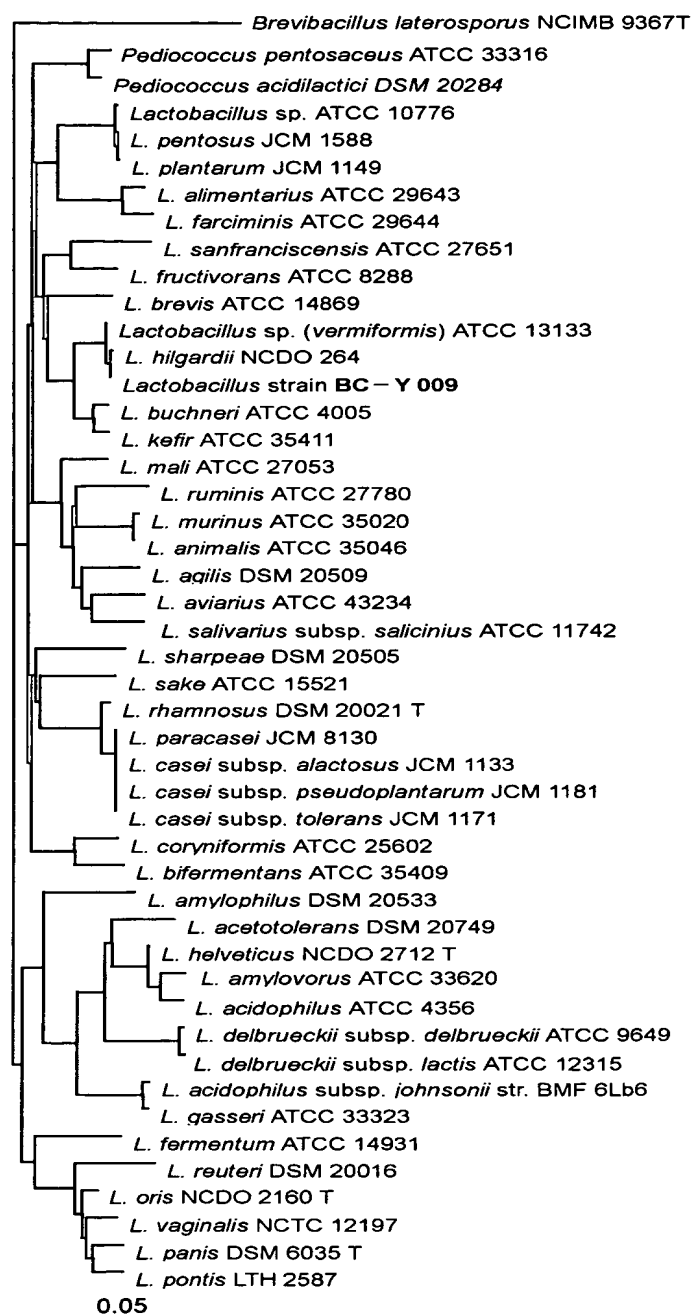


【도 7】



【도 8】

락토바실러스 BC-Y009 의 계통분석도



【도 9】

아세트박터 BC-Y058 의 계통분석도

